

〔研究ノート〕

## タマネギ成分ケルセチンの骨形成促進作用 に関する研究

岡田亜紀子・白石貴子・不破眞佐子・宮内智美・海老沢秀道

Study on Bone Protective Functions of Major Onion-flavonoid, Quercetin  
in Osteoporosis-model Rats

Akiko OKADA, Takako SHIRAISHI, Masako FUWA, Tomomi MIYAUCHI  
and Hidemichi EBISAWA

The objective of the present study was to elucidate the effects of dietary quercetin on the bone protective function from the viewpoint of osteoblast-activation. Ovariectomized female Wistar rats fed an experimental diet supplemented with 0% (OVX-CA) or 0.25% quercetin (OVX-QUE) were given 13 g per day for 12 weeks. As a positive control, soy isoflavone supplemented diet (OVX-IF) was also prepared.

As a result, rats fed dietary quercetin showed that there were no significant differences in the body weights, blood biochemical analyses and organ weights than that of the rats fed control diet. Serum osteocalcin levels, the bone-formation marker, showed a relatively higher value in group OVX-QUE than that of group OVX-CA. But, apparent higher values in bone mineral density (BMD) were not observed in this study, unfortunately. Osterix and Twist expressions, one of the osteoblast differentiation factors in rat femur showed a relatively higher value in group OVX-QUE than that of group OVX-CA. Runx-2 expressions in rat femur were not detected in this study.

These results suggested that dietary quercetin has a bone protective function via activation of osteoblast differentiation process in ovariectomized female rats.

*Key words:* quercetin (ケルセチン), osteoporosis (骨粗鬆症), RT-PCR (RT-PCR), rat (ラット)

### 【研究目的】

高齢者の QOL 低下の大きな原因として、骨折による寝たきり状態の招来がある。介護保険制度における要介護認定の原因は、多くが明らかな疾病を持たない老年症候群と呼ばれるもので占められている。老年症候群とは、高齢による衰弱、転倒・骨折、認知症、関節疾患を指すが、これらの症状は 75 歳以上の後期高齢者ではいっそう顕著になることがわかっている。

骨は、破骨細胞による分解（骨吸収）と骨芽細胞

による形成（骨形成）により維持されている。成人では骨吸収と骨形成が釣り合っている（カップリングという）が、成人期以降加齢に伴い骨吸収に傾いて骨量は減少し続け（アンカップリングという）、骨粗鬆症を発症することになる。とりわけ、女性は閉経に伴うエストロゲン分泌低下に起因する骨吸収抑制作用の減少により骨粗鬆症発症リスクが著しく高まる。骨粗鬆症治療法としてエストロゲン投与療法が有効とされているが、一方ではエストロゲンは乳がんや子宮がんの発症リスクを高めるという副作用が認められていることから、副作用の少ない骨粗鬆

症抑制因子の検索が望まれている。

我々はこれまで骨粗鬆症モデルラットを用いて、食事性ポリフェノール、主に大豆イソフラボン抽出物の骨粗鬆症制御因子としての有効性および作用機序を検証し(1)、大豆イソフラボンは主に骨吸収を抑制することによって骨量を維持することが明らかとなった。すなわち大豆イソフラボンは骨量を増加しない。そこで、骨形成促進に対して有意に働く可能性が高いと考えられる食事性フラボノイドを検索することにした。

ケルセチンは、野菜、果物、お茶などに多く含まれているフラボノイドで、とくにタマネギの皮に多く含まれている(2)。ケルセチンに関する研究では、抗心臓血管疾患、抗酸化性、抗ガン性、抗アレルギー性など多様な体調節作用が認められているが(3-5)、骨の代謝とケルセチンの関係特に骨形成に関する研究は十分行われていない。ヒト細胞を用いた *in vitro* 研究は、ケルセチンはヒト間葉系幹細胞の脂肪細胞及び軟骨細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化の過程を誘導することを報告している(6)。しかし、ケルセチンを食事として摂取したときに骨芽細胞形成が高まるか否かについては全く不明である。

本研究の目的は、食事由来ケルセチンが骨形成を促進するか否かを確認し、その作用機序を解明することである。

## 【実験方法】

### 1) 実験動物

ヒトの骨は成長期以降リモデリングにより作り変えが行われるが、ラットの骨は成長期以降も成長し続け、ラットの骨量は高齢期まで増加し続ける。すなわち、ラットの骨代謝は、ヒトと異なり、モデリングタイプであるため、*intact* な条件ではヒト骨粗鬆症のモデルになり得ない。そこで雌ラットの卵巣を外科的に切除して骨代謝をリモデリングタイプに変え、ヒト骨粗鬆症モデルとしている。本研究では、8週齢のウィスター系雌ラットを実験動物として用

いた。1群5匹とした。これらラットにネンブター麻酔下で卵巣摘出手術(OVX)を施し、骨粗鬆症モデル動物を作成した。

### 2) 飼育環境

ラットは、個別ケージに収容し、12時間明暗サイクルを持った空調完備の動物室で飼育した。水は、感染症の発症リスクを低下させるために、水道水を自由に与えた。水道水は、通常塩素殺菌が行われており、SPF (specific pathogen free) 条件でない飼育室での動物実験では、感染症抑制に有効と考えられる。

### 3) 実験食

ラットの骨代謝、特に骨形成過程に対するケルセチン摂取の影響を調べるため、20% カゼインタンパク質食 (20CA 食, コントロール食, OVX-CA 群), ケルセチンを 0.25% 添加した食餌 (実験食, OVX-QUE 群), および大豆イソフラボン抽出物を 0.10% 添加した食餌 (OVX-IF 群) を作成し、OVX ラットにこの何れかの食餌を投与した。本研究で用いた大豆イソフラボン抽出物は、ダイゼイン類を主成分としており、これまでに我々の研究グループで骨密度維持作用が確認されている。

食事摂取量の相違はカルシウムやマグネシウムなどミネラル類の摂取量に影響する。そこで、実験食は全ての餌を食べきってしまう量として1日13g投与した。実験食期間は早期における効果を評価するために8週間とした。実験食の組成を Table 1. に、大豆イソフラボン抽出物のイソフラボン組成を Table 2. に示した。

### 4) 72 時間尿の採取

実験食期期末3日間について、代謝ケージを用いて、全ての尿を採取した。そして、骨吸収マーカー測定のために $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 5) 屠殺条件

実験食期終了後、ラットをネンブター麻酔下で採血・屠殺した。採血後直ちに大腿骨を摘出し、次

Table 1. Compositions of experimental diet

Ingredients	OVX-CA	OVX-IF	OVX-QUE
	g/1000 g		
Isoflavone extract	0	2	0
Quercetin	0	0	2.5
Casein	220	220	220
$\alpha$ -Corn starch	406.6	405.4	405
Sucrose	203.4	202.6	202.5
Cellulose powder	50	50	50
Mineral mixture	50	50	50
Vitamin mixture	20	20	20
Corn oil	50	50	50

Table 2. Isoflavone composition of isoflavone extract<sup>1</sup>

(%)					
Daidzin	33.76	Genistin	6.89	Glycitin	16.44
Malonyl Daidzin	25.53	Malonyl Genistin	6.09	Malonyl Glycitin	9.68
Acetyl Daidzin	0.54	Acetyl Genistin	0.13	Acetyl Glycitin	0.8
Daidzein	0.07	Genistein	0.02	Glycitein	0.06

<sup>1</sup>Soyaflavone HG: soy isoflavone extracted from soybean hypocotyl, gifted from Fujioil Co, Osaka. <sup>1</sup>Isoflavone content of Soyaflavone HG was calculated as 45%.

いで子宮、腎臓、肝臓、心臓、脾臓を摘出した。左大腿骨は、mRNA 発現測定のため、液体窒素で固定後、 $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。右大腿骨は骨密度測定のため、ホルマリン溶液に保存した。腰椎骨密度測定のため、ラット屠体は $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

#### 6) 骨代謝マーカーおよび骨密度の測定

骨形成マーカーの血清オステオカルシン濃度を ELISA 法で測定した。また血液生化学検査を行った。

骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリンを ELISA 法で測定した。

大腿骨および腰椎 ( $L_{2-4}$ ) の骨密度及び骨塩量を Lunar 社製エックス線骨密度計 pixy-mus で測定した。骨密度 (Bone mineral density, BMD) はエックス線照射による透過率から計算される CT 値を基にした骨塩量 (Bone mineral content, BMC) を骨断面積で除した値として算出された。

#### 7) 大腿骨における mRNA 発現の測定

ケルセチン摂取によって、大腿骨における骨の細胞での代謝がどの様に変化するかを観察するために、海綿骨リッチな大腿骨遠位端付近の骨から総 RNA (T-RNA) を抽出し、いくつかのシグナル伝達物質の mRNA 発現を測定した。

mRNA の発現は、Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により実施した。

大腿骨遠位端を液体窒素凍結下で破碎し、AGPC 法により、Total RNA (T-RNA) を抽出した。T-RNA を定法により逆転写酵素を用いて cDNA とした後、目的遺伝子を PCR 法により増幅した。mRNA 発現量は GAPDH の発現量に対する比率 (Arbitural density) として計算した。本研究で用いたプライマーセットの cDNA 配列は Figure 1. に、PCR に用いた温度設定条件は Figure 2. に示した。

#### 8) 統計解析

得られた測定結果は、平均値±標準偏差として表記し、一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。

Primer sequence	
Twist	
antisense(R)	CCCCCTCCATCCTCCAGAC
sense(F)	CAGCGGGTCATGGCTAAC
Osterix	
antisense(R)	TGGGATCCCAGCTGTGAATGGGCTTCTT
sense(F)	GTGAATTCACCTTTCAGCCCCCAAACC
Runx-2	
antisense(R)	ATCTGACTCTGTCCTTGTGG
sense(F)	GGCAAGATGAGCGACGTGA

Figure 1. Primer sets for PCR

GAPDH	Twist	Osterix	Runx-2
94°C×5 min	94°C×5 min	94°C×5 min	94°C×5 min
94°C×30 sec	94°C×1 min	94°C×1 min	94°C×1 min
60°C×30 sec	58°C×1 min	63°C×1 min	55°C×1 min
72°C×1 min	72°C×1 min	72°C×1 min	72°C×2 min
30 cycle	50 cycle	50 cycle	50 cycle
72°C×5 min	72°C×7 min	72°C×7 min	72°C×7 min

Figure 2. Thermal conditions for PCR

ANOVA で有意となった数値について、Student の *t*-test により各群間の有意差検定を行った。

## 【結果と考察】

### 1 摂食量と体重変化

実験食投与期間中の体重変化を Figure 3. に示した。

実験食期間中すべてのラットの体重は増加した。また、ラットは与えた餌をすべて摂取した。屠殺時における平均体重は、OVX-CA 群で  $239.7 \pm 9.2$  g, OVX-IF 群で  $242.1 \pm 12.8$  g, OVX-QUE 群で  $242.5 \pm 12.0$  g となり、各群間に有意差は認められなかった。

### 2 血液性状

ラットの血液生化学分析の結果を Table 3. に示した。

血清総タンパク質、アルブミン、カルシウム、クレアチニンなどは、全てのラットで正常範囲の値を示した。肝機能検査項目の AST/ALT はいずれの群もやや高い値を示したが、OVX-CA 群に比べて

OVX-QUE 群の ALT 活性は 53% 低値を示した。

以上のように本研究結果では、ケルセチン投与はラットの血液性状に影響しなかった。

### 3 臓器重量

ラットの臓器重量を Table 4. に示した。

ケルセチンはエストロゲン作用が弱く、子宮に殆ど影響しないと考えられている。OVX-QUE 群の子宮重量は OVX-CA 群と比べて有意な増加を示さなかった。すなわち、食餌に 0.25% の比較的大量のケルセチンを投与した本実験条件でも、ケルセチンは子宮に影響しなかった。

子宮以外のその他の臓器の重量にも OVX-CA 群と OVX-QUE 群の間に有意差は見られず、また屠殺時における目視による病理所見においても各臓器に明らかな病変は見られなかった。

以上のように、血液分析及び臓器重量の結果から、成長期動物の食餌への 0.25% ケルセチン投与は低たんぱく質栄養状態、子宮の肥大および萎縮および肝機能障害をもたらさなかった。

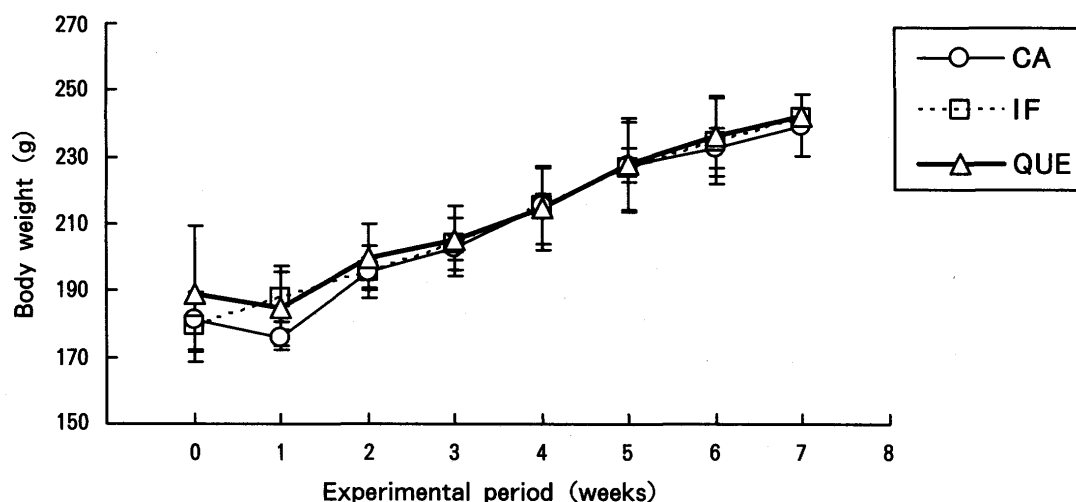


Figure 3. Effects of dietary quercetin on changes in body weight in OVX rats

Table 3. Effects of dietary quercetin on blood analyses in OVX rats

Group	n	Total protein	Albumin	Calcium
		g/100 ml	g/100 ml	mg/100 ml
OVX-CA	5	6.2±0.8	4.3±0.7	8.9±0.3
OVX-IF	5	5.7±0.5	4.0±0.2	9.3±0.3
OVX-QUE	5	6.6±1.5	4.5±1.1	10.1±0.6
	n	Creatinine	AST	ALT
		mg/100 ml	karmen	karmen
OVX-CA	5	1.05±0.08	109±26	36±26
OVX-IF	5	1.18±0.17	114±13	37±8
OVX-QUE	5	1.24±0.15	109±21	19±2

No significant differences were observed among the groups.

OVX: Ovariectomized rat. Values were expressed as mean±SD.

Table 4. Effects of dietary quercetin on organ weights in OVX rats

	n	Uterus	Kidney(R)	Liver
		g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
OVX-CA	5	1.37±0.80	3.11±0.22	32.14±2.33
OVX-IF	5	0.86±0.60	2.95±0.17	31.55±1.86
OVX-QUE	5	1.39±0.73	3.27±0.39	31.96±5.10
	n	Spleen	Heart	
		g/kg BW	g/kg BW	
OVX-CA	5	2.00±0.38	3.25±0.31	
OVX-IF	5	2.04±0.14	2.99±0.35	
OVX-QUE	5	1.99±0.41	3.04±0.34	

Kidney: Weights of right kidneys were measured.

No significant differences were observed.

#### 4 骨密度と骨代謝マーカー

デオキシピリジノリン (DPN) は骨コラーゲンタンパク質の分解産物であり、オステオカルシンは骨形成促進作用を持つ Gla タンパク質である。そのため、尿中 DPN は骨吸収量を反映し、オステオカルシンは骨形成能を反映する。これら骨代謝マーカーの測定結果を Table 5. に示した。

骨形成マーカーの血清オステオカルシンは、大きな個体差のため有意差は得られなかったが、OVX-QUE 群は OVX-CA 群に比べて 158% 高値傾向を示した。

一方、骨吸収マーカーの尿中 DPN 排泄量は、OVX-QUE 群と OVX-CA 群間に差は見られなかった。

以上のように骨代謝マーカーの結果は、イソフラボンが骨吸収抑制による骨量維持作用を示すのとは異なり、ケルセチンは骨形成を高める可能性を示している。

骨密度の結果は Table 6. に示した。ラットの骨密度は、これまでの我々の高齢期ラットでの BMD 値  $0.20 \text{ g/cm}^2$  に比べると明らかな低値を示していた。OVX-QUE 群の大腿骨骨密度は OVX-CA 群のそ

れとほとんど差が無く、いずれもおよそ  $0.16 \text{ g/cm}^2$  の値を示した。すなわち本研究条件ではケルセチン投与による骨密度の増加は観察されなかった。腰椎骨密度でも、大腿骨同様に、ケルセチンの骨密度上昇作用は観察されなかった。この理由として、食餌投与期間が 8 週間と、骨の研究としてはやや短期間であったことが挙げられる。そのため、ポジティブコントロールとして設定した OVX-IF 群でも、本研究では、骨密度の増加は認められなかったものと考えられる。より長期間の観察が必要であり、骨代謝研究における実験期間の重要性が、図らずも示された。

#### 5 骨芽細胞増殖因子の発現

〈遺伝子レベルでのタマネギ成分ケルセチンの骨形成促進作用〉

骨格系形成細胞すなわち、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、腱細胞、繊維芽細胞は共通の間葉系幹細胞から分化していく。

間葉系幹細胞が前骨芽細胞、未熟骨芽細胞、成熟骨芽細胞、骨細胞と分化する過程で Runx-2 は間葉系幹細胞から骨芽細胞系列への分化を決定す

Table 5. Effects of dietary quercetin on bone metabolic markers

	n	DPN	Osteocalcin
		nM	ng/ml
OVX-CA	5	$15.2 \pm 3.11$	$3.16 \pm 1.87$
OVX-IF	5	$22.8 \pm 14.4$	$4.94 \pm 2.50$
OVX-QUE	5	$14.6 \pm 6.15$	$5.00 \pm 1.68$

DPN: Urinary deoxypyridinoline excretion. Osteocalcin: Serum osteocalcin concentration  
No significant differences were observed.

Table 6. Effects of dietary quercetin on femoral-BMD and BMC in OVX rats

		Femur		Lumber ( $L_{2-4}$ )	
	n	BMD	BMC	BMD	BMC
		$\text{g/cm}^2$	g	$\text{g/cm}^2$	g
OVX-CA	5	$0.165 \pm 0.009$	$0.297 \pm 0.016$	$0.151 \pm 0.009$	$0.272 \pm 0.018$
OVX-IF	5	$0.158 \pm 0.005$	$0.282 \pm 0.011$	$0.161 \pm 0.009$	$0.286 \pm 0.022$
OVX-QUE	5	$0.164 \pm 0.014$	$0.290 \pm 0.030$	$0.155 \pm 0.026$	$0.269 \pm 0.039$

No significant differences were observed.

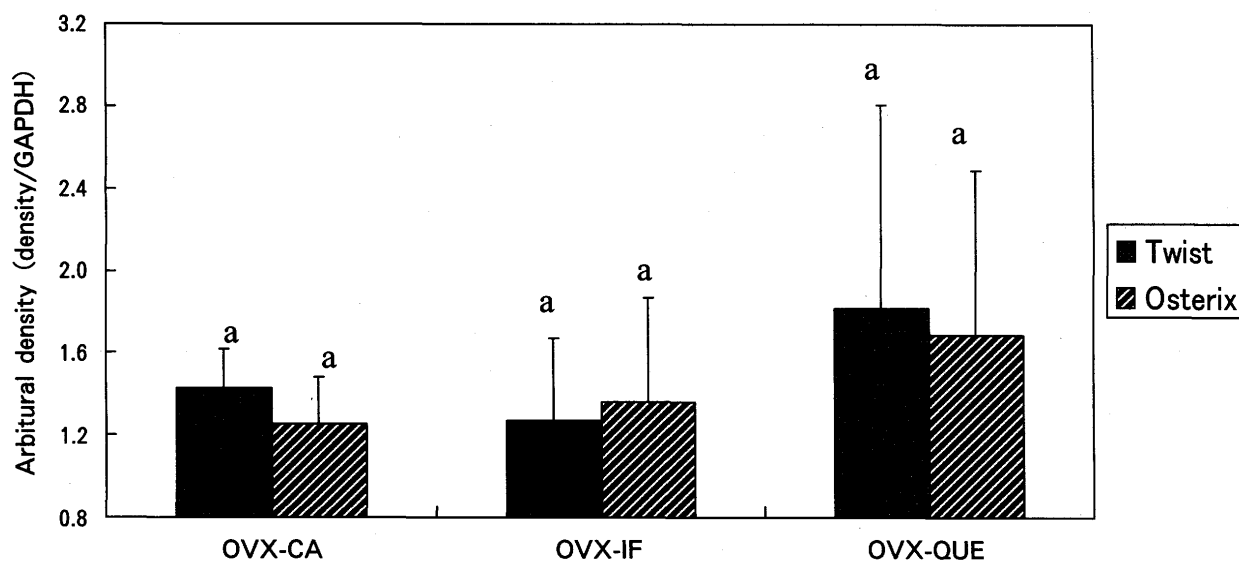


Figure 4. Effects of quercetin intake on expressions of osteoblast-activating factor in ovariectomized female rats

No significant differences were observed among the groups.

る(7,8)。Runx-2は骨芽細胞分化早期では分化を促進し、後期では抑制的にはたいて骨細胞への分化を抑制する(8)。

一方Osterixは、前骨芽細胞から未熟骨芽細胞への分化を促進し、軟骨細胞への分化能を完全に遮断する(7)。すなわち、骨芽細胞への分化を誘導する。TwistはRunx-2と結合し、Runx-2の機能を抑制する。

そこで、海綿骨リッチな大腿骨遠位端におけるTwist、OsterixおよびRunx-2のmRNA発現をRT-PCR法により測定した。しかし、本研究条件では、大腿骨遠位端におけるRunx-2の発現は確認できなかった。

TwistおよびOsterixの発現をFigure 4.に示した。

TwistおよびOsterix共にOVX-QUE群はOVX-CA群に比べて、大きな個体差のため有意差は得られなかったが、およそ1.3倍の高いmRNA発現を示した。

このように、これらの遺伝子発現がOVX-QUE群で高値傾向を示したことから、食餌ケルセチンは、in vitroでの研究結果(9)同様に本研究のようなin

vivo条件でも、骨芽細胞への分化の過程を誘導する可能性が示された。本研究ではRunx-2の発現を測定できなかったが、OsterixはRunx-2の下流にあることがわかっている(7)。我々は、ケルセチンはRunx-2の発現を抑制してOsterixの発現を高めたのではないかと推定している。この点については、Runx-2の測定も含めて、今後の課題である。

以上のように、食餌への0.25%ケルセチン投与は、骨密度の上昇に先駆けて、海綿骨における骨芽細胞分化誘導因子の発現を高める可能性が示された。骨吸収抑制因子との併用によって、ケルセチンによる骨粗鬆症の短期治療の可能性が拓かれるものと期待される。

## 【要 約】

若齢ラットにOVXを施し、骨粗鬆症モデルラットを作成した。これらラットにケルセチンを0.25%含んだ実験食を1日13gの食餌制限条件で8週間投与した。

その結果コントロールに比べて、1)体重は増加し、正常な成長を示した。2)血液分析の結果、測定した全ての項目は正常範囲内の値を示した。3)臓器重量は、子宮を含めて、萎縮あるいは肥大は観

察されなかった。4) 骨密度は増加しなかったが、骨形成マーカーは高値傾向を示した。5) 骨芽細胞への分化誘導因子である Osterix と Twist は、共に大腿骨遠位端における mRNA 発現が高値傾向を示した。しかし、Runx-2 の発現は検出できなかった。

以上の結果から、ケルセチンは副作用の少ない食事性骨形成促進因子である可能性が示された。

## 【参考文献】

1. 海老沢秀道, 腰原康子: 加齢ラットの骨代謝に対する大豆イソフラボン混合物投与の影響, 大豆たん白質研究, 3, 87-94, 2000.
2. Nemeth K and Piskula MK: Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 47: 397-409, 2007.
3. Williamson G and Manach C: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 243 S-255 S, 2005.
4. 清水俊雄編: 機能性食品素材便覧, 薬事日報社, 2004.
5. Ferrer EG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB, Lezama L, Rojo T, Williams PA: Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl(IV) complexes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11: 791-801, 2006.
6. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS: Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells, *Biochem. Pharmacol.*, 72: 1268-78, 2006.
7. Komori T: Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors, *J. Cell Biochem.*, 99: 1233-39, 2006.
8. 高柳広編: わかる実験医学シリーズ 骨研究がわかる ~シグナル研究から広がる, 骨代謝と生態制御のクロストーク, 羊土社, 2005.
9. Prouillet C, Mazière JC, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S: Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human

osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway, *Biochem. Pharmacol.*, 67: 1307-13, 2004.

(おかだ あきこ 生活機構研究科生活科学研究専攻2年)

(しらいし たかこ 生活科学科)

(ふわ まさこ 生活科学科)

(みやうち ともみ 生活科学科)

(えびさわ ひでみち 生活機構研究科)